

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-272990

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和62年(1987)11月27日

C 12 P 21/00  
C 07 K 15/12  
C 12 N 9/00

6712-4B

8318-4H

7823-4B ※審査請求 未請求 発明の数 4 (全23頁)

⑥ 発明の名称 リガンド、そのアンタゴニストまたはアゴニストの効率的な測定のためのハイブリッドリセプター

⑦ 特 願 昭62-107893

⑧ 出 願 昭62(1987)4月30日

優先権主張 ⑨ 1986年4月30日 ⑩ 米国(US) ⑪ 857899

⑬ 発 明 者 トーマス・ジョセフ・アメリカ合衆国カリフォルニア94122、サン・フランシスコ、グレート・ハイウェイ 1850番

⑭ 発 明 者 ヘイモ・リーデル アメリカ合衆国カリフォルニア94131、サン・フランシスコ、ウオーレン・ドライブ・ナンバー301、480番

⑮ 出 願 人 ジェネンテック、インコ アメリカ合衆国カリフォルニア94080、サウス・サン・フランシスコ、ポイント・サン・ブルーノ・ブールバード460番

⑯ 代 理 人 弁理士 青山 葆 外1名  
最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

リガンド、そのアンタゴニストまたはアゴニストの効率的な測定のためのハイブリッドリセプター

## 2. 特許請求の範囲

1. (a) 予め定められたリセプターのリガンド結合領域と、(b) ヘテロローガスなりポーターポリペプチドとを含有するハイブリッドリセプター。

2. リガンド結合領域が予め定められたリセプターの細胞外領域で構成されている第1項記載のハイブリッドリセプター。

3. リポーターポリペプチドがリセプターまたは腫瘍遺伝子の細胞質領域である第1項記載のハイブリッドリセプター。

4. リポーターポリペプチドが酵素である第1項記載のハイブリッドリセプター。

5. リガンドのハイブリッドリセプターへの結合によって酵素が立体的に阻害されない第4項記載のハイブリッドリセプター。

6. 酵素がホスホリルキナーゼである第4項記載のハイブリッドリセプター。

7. リガンド結合領域とヘテロローガスなりポーターポリペプチドとの間に挿入されたトランスメンブラン領域を有する第1項記載のハイブリッドリセプター。

8. (a) 予め定められたリセプターのリガンド結合領域と、(b) ヘテロローガスなりポーターポリペプチドとを含有するハイブリッドリセプターをコードしている核酸。

9. 複製可能なベクターをも含有している第8項記載の核酸。

10. 宿主細胞をも含有している第9項記載のベクター。

11. (1) 予め定められたリセプターのリガンド結合領域と、(2) ヘテロローガスなりポーターポリペプチドとを含有するハイブリッドリセプターの製造方法であって、

(a) ハイブリッドリセプターの転写をコントロールするためのプロモーターと機能的に結合して

いるハイブリッドリセプターをコードしている核酸を含有するベクターで宿主細胞を形質転換し、さらに、

(b) ハイブリッドリセプターの発現のための条件下で宿主細胞を培養することからなる方法。

12. 宿主細胞の培養培地からハイブリッドリセプターを回収することを含む第11項記載の方法。

13. 宿主細胞の細胞膜からハイブリッドリセプターを回収することを含む第11項記載の方法。

14. 生物学的に活性なリガンド、あるいは該リガンドのアntagニストまたはアグニストを測定する方法であって、

(a) (1) リガンド、アntagニストまたはアグニストのための結合領域と、(2) ヘテロログスなリポーターポリペプチドとを含有するハイブリッドリセプターを得、

(b) このリセプターを、リガンド、アntagニストまたはアグニストを含有することが疑われている被検試料と一緒にインキュベートし、

(c) リポーターポリペプチド中の変化を検出し、

方法。

20. リポーターポリペプチドと結合し得る抗体とリセプターとと一緒にインキュベートし、結合したポリペプチドまたは結合せずに残存するポリペプチドを測定することにより、免疫エпитープに於ける変化を検出する第19項記載の方法。

21. リポーターポリペプチドが、さらに、安定なフリーラジカル基、蛍光性の基または化学発光性の基を含有しており、リポーターポリペプチドの変化を、安定なフリーラジカルの回転モーメントの変化、あるいは、蛍光性または化学発光性の基の強度、波長または分極における変化の測定によって検出する第14項記載の方法。

22. リポーターポリペプチドがGタンパク質と結合し得るものである第14項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、通常インビボにおいてリセプター(受容体)と相互作用するリガンドの機能をまねるようになしてあるいは該機能に拮抗するようにして、

さらに、

(d) 該変化を被検試料中のリガンド、アntagニストまたはアグニストの存在と関連づけることからなる方法。

15. リガンドがポリペプチドであり、リガンド結合領域がイムノグロブリンの抗原結合部位ではない第14項記載の方法。

16. リポーターポリペプチドにおける変化が該ポリペプチドの酵素活性の変化である第14項記載の方法。

17. リポーターポリペプチドにおける変化が該リポーターポリペプチドの自己りん酸化である第14項記載の方法。

18. 被検試料がアntagニストを含有していることを疑われるものであり、リセプターを、該被検試料および予め活性が決定されているリガンドまたはリガンドアグニストと一緒にインキュベートする第14項記載の方法。

19. リポーターポリペプチドにおける変化が免疫エピトープにおける変化である第14項記載の

該リセプターと結合する能力について、候補薬物をスクリーニングする方法に関するものである。また、本発明はリガンドの機能的な分析法に関するものである。

#### 発明の構成および目的

リセプターは細胞表面に存在し、シグナル伝達機能を有するタンパク質性の巨大分子と定義される。細胞膜の外表面には多くのリセプターが存在する。

これらの細胞表面リセプターは細胞外領域と細胞質(内)領域とを有しており、細胞外領域と他の細胞の物質とは特異的に結合することができ、この細胞外領域による物質への結合作用の結果、細胞質領域と他の細胞分子とが相互作用する。リセプターによって結合される物質はリガンドと呼ばれるが、この言葉は、その相手であるリセプターとの関連においてのみ、明確に定義されるものである。「リガンド」という用語は、その物質が、リセプターがリガンドの存在に関する情報を別の分子に伝えるような方法で、該リセプターと結合

し、開裂し、あるいはリセプターと相互作用するというものを除けば、特定の分子量、他の構造上の特徴または構成上の特徴を暗示するものではない。言い換えると、リセプターと結合し得る物質の全てがリガンドであるとは限らないが、リガンドは全てリセプターと結合し得る。リセプターには、免疫グロブリンの様な物質は含まれない。

リセプターは、一般に、構造上3領域に分けられる。リセプターを細胞表面にうめ込むのに関与していると考えられる約20～25残基からなる疎水性の高い領域は、そのアミノ末端およびカルボキシ末端で、それぞれ細胞外環境および細胞質領域(細胞内環境)へ伸びている領域と、その境を接している。この細胞外領域にはリガンド結合領域が含まれている。細胞質領域には細胞質に変化を起こさせる領域が含まれている。一般に、細胞質領域には、リガンドの結合により引き起こされるリセプターの凝集または立体配座の変化により活性化される酵素機能が含まれている。

リセプターは、様々な言葉で表わされる活性化

能的に生存可能な状態に維持することが困難である。その上、組織標本に対して候補薬物を確実に、かつ再現性よく投与することはしばしば困難である。組織培養中で一次外移植組織(エクスプラント)を用いるスクリーニングアッセイは、組織標本を用いて行なわれるアッセイ(分析)よりも大規模に行なわれ得る。しかしながら、生理学的な作用を分析することはより困難であり、その様な分析は、培養培地や培養条件等、多くの干渉源による干渉を受ける。最後に、天然物質から単離したリセプターを用いる分析法には、リセプターが自然に変化し得ること、および適当な天然の供給源が常に手に入るとは限らないという不都合がある。本発明は、リガンドの結合のみならず、リガンドのアゴニストまたは拮抗物質としての結合特性を決定するための、大規模な実施が可能であり、再現容易で簡便な分析システムを提供することを目的とするものである。

同様に、有意義な臨床診断は、しばしば不活性形のリガンド(例えばリガンドの活性を変化させ

またはシグナル導入(トランスダクション)のプロセスを通して機能すると考えられる。リガンドは、細胞質内におけるリセプター分子の立体配座を変化させるような方法で細胞外のリガンド結合領域と結合する。この立体配座の変化(活性化と呼ばれる)により、リセプターの細胞質成分に対する作用が変化する。リセプターの活性化によってもたらされる変化には、リセプターの酵素的作用の変化または発生が含まれる。

近年、製薬業界においては、疾病または傷害におけるリセプターの役割に関する研究に重点が置かれ、リセプターと結合し得る、一般に低分子量の物質である薬物の製造に向けて研究がなされてきた。初期のスクリーニングで同定された薬物は、生体内または体外移植組織中で所望の活性について試験される。結局、従来の方法では大規模なスクリーニングは不可能であった。即ち、標的であるリセプターを含有する組織標本または単離細胞(例えば心臓組織)の取得には多額を要し、これらは限られた量しか存在せず、また、これらを機

能に消滅させるような、試験対象の有する酵素作用または他の作用の下におかれたリガンド)の干渉を受けることなく、生物学的に活性なリガンドを分析することに依存している。被検試料中のリガンドの測定には、イムノアッセイが広範囲に用いられている。しかしながら、活性形のリガンドと不活性形のリガンドとを識別し得る抗体の同定は、往々にして極めて困難である。リセプターは、アナライト結合物質としてまれに抗体の代わりに用いられていた。しかしながら、リセプターと結合する物質の全てが、必ずしもリセプターの活性を誘発する、即ち、生物学的に活性であるとは限らない。本発明は、臨床的な被検試料中に含まれているリガンドであって、そのもののリセプターのシグナル導入を誘発し、あるいは阻害する作用を有するリガンドの同定法を提供するものである。

少くともいくつかの、インビトロで測定可能なリガンド相互作用依存性の既知の活性を有する多数のリセプターが同定されている。例えば、EG

Fが表皮成長因子受容体に結合することで、リセプターのホスホトランスフェラーゼ領域が刺激され、その細胞内の細胞質領域に存在している幾つかの標的アミノ酸残基がリン酸化される(自己リン酸化、オートホスホリレーションと称される過程)。また、リセプターは、そのホスホトランスフェラーゼ活性部位が位置している領域に結合する、抗体または特異的な細胞質内の基質ポリペプチド類をリン酸化することも知られている。不運にも、他のリセプターは、それらが高い親和性をもってリガンドと結合することが分かっているにもかかわらず、既知のリガンド依存性酵素活性を有しないか、あるいはそれらの活性が余りにも低く、リガンド依存性の活性化の定量分析が困難となっている。治療目的にとっては、その様な未解明のリセプターとリガンドとの相互作用に拮抗したり、それを促進することが望ましいが、関連組織が存在しない条件下、また幾つかの場合には、無傷の生物体の不在下では、ある候補薬物とリセプターとの結合が、単なる機能の中和の状態であ

後にさらされているリセプターに対するリガンドの作用に拮抗し得る物質、即ち、リガンド拮抗体(アンタゴニスト)をみつけることが目的となろう。他方、リガンド活性の不足によって特徴づけられる臨床症状のモデル治療は、不十分なリガンドまたはリガンド欠損を増強または補う薬物、即ち、リガンドアゴニストで構成されることになる。

本発明のハイブリッドリセプターは、リセプターに対して活性なアゴニスト薬物をみつけるためのスクリーニング法に有用である。ハイブリッドリセプターと候補薬物とをインキュベートし、ヘテロローガスなりポーターポリペプチドによるシグナルの生成を分析する。一般に、しかし必然的ではないが、リポーターポリペプチドによって生成されるシグナルは、リポーターポリペプチドの酵素機能の活性化または刺激作用として測定される。候補薬物のアゴニスト活性の定量を欲しないならば、既知型のリガンドを有するスタンダードを含有させる必要はない。実際、インビボでリセプターの活性を調整するリガンドは全く不明であ

るかを決定する方法も、候補薬物がアゴニストまたは拮抗体のいずれかとして結合していることを決定する方法も得られていない。従って本発明は、あるリガンドのリセプターが既知のシグナル導入特性を示さない場合に、候補薬物を、リガンドに対するアゴニストまたは拮抗体活性に関してスクリーニングする方法を提供することを目的とするものである。

#### 要約

これらの本発明の目的は、ヘテロローガス(異種)なりポーターポリペプチドであって、リセプターのリガンド結合領域にリガンドあるいはリガンドのアゴニストまたはアンタゴニスト(拮抗体)が結合した場合に、コンホメーション(立体配座)または機能面で分析可能な変化を生じ得るリポーターポリペプチドと、該リセプターのリガンド結合領域とが融合してなる新規なりセプターハイブリッドを用いることにより達成された。

ある疾病または傷が、特定のリセプターに作用するリガンドに起因するものである場合、その危

ることもある。本発明の分析系の1つの利点は、アゴニスト薬物を同定するのに、リセプターに対するリガンドも、リセプターのインビボにおけるシグナル導入機構もわかっていることを要しないという点にある。

本発明のハイブリッドリセプターは、アゴニスト薬物をスクリーニングすると同様の方法で、被検試料中の生物学的なりリガンドの量を測定するのに用いることができる。この用途は、既知のリガンドの測定を目的としているので、既知量のリガンドを用いて標準曲線を調製し、被検試料における結果と比較する。

拮抗(アンタゴニスト)薬物候補の選択も、ハイブリッドリセプターを既知のリセプターアゴニストとインキュベートすることを除き、アゴニストの同定に用いた方法と同様の分析法によって行われる。アゴニスト(薬物または正常な生体内リガンド)を、リセプターと候補薬物との接触の前、あるいは、好ましくは同時に、リセプターと共にインキュベートする。拮抗体(アンタゴニスト)活

性は、リポーターポリペプチドの変化に基づき測定されるアグニスト活性またはリガンド活性の変位の関数である。

本発明のハイブリッドリセプターは、リガンド・リセプター相互作用を分析するための、普遍的でポータブル(持ち運び可能)な分析系を得ることを可能ならしめた点で、特に有益である。本発明においては、ポータブルなリポーターポリペプチドとして第1リセプターの細胞質内領域を選択しようとするものである。この領域を他のリセプターの細胞質内領域で置換して本発明のハイブリッドリセプターを調製する。第1リセプターに有用な分析系(例、自己りん酸化分析)はその第1リセプターの細胞質領域を含む他の全てのハイブリッドリセプターに用いることができる。

#### 図面の簡単な記述

第1図は、インシュリンリセプターと表皮性成長因子のリセプターとのハイブリッドを発現させるのに用いられるプラスミドの構成を示す図である。種々のリセプター突然変異体をコードしてい

1、「ネイチャー(Nature)」293:79の配列を、大腸菌内でプラスミドを複製させるために存在させた。

第1b図はインシュリン・リセプター(HIR)、EGFリセプター(HER)およびそれらから調製されたハイブリッドリセプターであるIERおよびI $\alpha$ ERを比較した模式図である。ヒトEGFリセプター(HER)、ヒトインシュリンリセプター(HIR)、インシュリンリセプターとEGFリセプターのキメラ(IER)、およびインシュリン- $\alpha$ -サブユニットリセプターとEGFリセプターのキメラ(I $\alpha$ ER)を平行に並べ、HIR $\alpha$ 配列( $\alpha$ )の暗号領域を点線で示したボックス、HIR $\beta$ 配列のそれを斜線で陰影をつけたボックス、そして、HER配列のそれを空白ボックスで示した。暗号領域はトランスメンブラン領域と一列に並んでいる(等尺で描かれていない)。タンパク質のシグナル配列の暗号セグメントは(S)で表示されており、前駆体開裂部位は縦線で示されている。ヘテロロガスなリセプターのcDNAの連結部

領域は陰影を付した棒で示されている(cDNA)。SV40初期プロモーター配列は太く黒い矢印で示されており、ポリA付加部位には印が施されている。プラスミドの組立てに用いたジヒドロ還元酵素(DHFR)暗号配列[シモンセン(Simonson)およびレビンソン(Levinson)、1983、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」80:2465-2499]と制限部位とが示されている。両cDNAの発現は、シミアン(Sialan)ウィルス(SV)40の初期領域のプロモーター配列、およびB型肝炎ウィルスの表面抗原をコードしている3'非翻訳配列[クローレイら(Crowley)、1983、「モレキュラー・セルラー・バイオロジー[Mol. Cell. Biol. ]」3:44-45]によってコントロールされる。複製起源とアンピシリン耐性遺伝子とを含有している大腸菌プラスミドpML[哺乳類細胞内で用いるのに適したpBR322誘導体;ラスキイ(Lusky)およびボツチャン(Botchan)198

はジグザグラインで示されており、この連結に用いられた合成オリゴヌクレオチドは黒色の棒で示されている。組立てに関連したDNA制限エンドヌクレアーゼ開裂部位はcDNA配列の上方に示されている。

第2図は、対照である発現ベクターでトランスフェクトされたCOS-7細胞と比較して、第1a図のcDNA組立て物でトランスフェクトされたCOS-7細胞では、<sup>125</sup>Iインシュリンと結合したCOS-7細胞が多いことを示す図である。

第3a~3d図は、実施例に示す如く、様々な形質転換細胞および対照細胞から得られた自己りん酸化産物の界面活性剤処理によるリゼイトの適当な抗体による免疫沈降物をSDS PAGE還元ゲル電気泳動にかけて得た泳動パターンを示す図である。(+)および(-)ゲルはインシュリンまたは(A431の場合には)EGF-処置リセプターを誘発する。開裂の数字はマーカー分子量である。第3a図は対照であるmock-形質転換細胞と組換え形質転換細胞の抗-HER-免疫沈降自己りん

酸化産物を示す。この図は、組換え体内でインシュリン-EGFハイブリッドリセプター組立物が発現したことを示している。

第3b図は、インシュリンリセプターの全細胞外領域を含有するハイブリッドの自己りん酸化がインシュリンによって活性化されることを示している。

第3c図は、インシュリンにより活性化されたIERリセプターの自己りん酸化の動力学を示す図である。この図から、自己りん酸化は、りん酸化の反応時間に依存していることが分る。

第3d図はインシュリンによる活性化の後におけるIERリセプターのSDS-PAGEの移動度の変化を示す図である。

第4図は表皮性成長因子の細胞外領域と、リポーター分子として作用するerbB腫瘍因子のフラグメントとを含有するハイブリッドリセプターである、HER-erbBの構造を示す図である。

第5図は、リガンド(EGF)の存在下(+)または非存在下(-)における腫瘍因子-リセプターの

アゴニストまたは拮抗体のスクリーニングにあるときは、そのリガンドに対する既知のリセプターから、リガンド結合部位を選択する。リガンドが既知であって、そのリセプターが既知でない場合には、リガンドの細胞表面リセプターを同定する必要がある。このことは、1)リガンドが結合するか、あるいは機能的に相互作用することが分かっている組織細胞を得、2)その細胞から既知の方法で膜タンパク質製品(標本)を得、3)この製品をリガンドとインキュベートし、4)インキュベーション混合物からリガンド-リセプター-コンプレックスを分離し[例えば、リガンドを、臭化シアンで活性化したセファロースに予め不溶化しておく]、5)リセプターをリガンドから分離し、6)リセプター部分のアミノ酸配列を得、7)決定したアミノ酸配列をコードしている核酸プローブを調製し(約40bp以上の長い1本のプローブ、あるいは、短いプローブのプールのいずれか)、8)リセプターが得られた生物または細胞から、cDNAまたはゲノムDNAファージライブラリ

ハイブリッド組立物の自己りん酸化を示すゲル電気泳動を要する図である。

#### 詳しい記述

本明細書に記載した方法の中心はハイブリッドリセプターである。これは、基本的に、リガンド結合領域とリポーターポリペプチドとから成る。リガンド結合領域はリセプターの細胞外領域に位置している。リガンドの結合に関与している正確なアミノ酸配列を同定することは、しばしば困難である。実際、リガンドの結合に関連する幾つかの領域があり、特に、リガンドがポリペプチドである場合にはそうである。従って、リセプターの細胞外領域の全てがハイブリッドを形成していることが好ましい。このことはまた、リガンド結合領域を確実に、正しい立体配座に保つことにも役立つ。

適当なリガンド結合領域は、幾つかの方法の内どれかを用いて選択する。まず、そのハイブリッドリセプターの使用目的が、被検試料中の既知のリガンドの分析、あるいは、その様なリガンドの

一、あるいはプラスミド(ベクター)ライブラリーを調製し、9)プローブとライブラリーとをハイブリダイズしてリセプターをコードしているDNAを含有しているプラスミドまたはファージを同定し、10)アミノ末端からトランスメンブラン(膜通過)配列までの領域を同定するのに必要な程度のヌクレオチド配列と推定のアミノ酸配列とを決定する。リセプターの細胞外領域全部をコードしているDNAを含んでいる単一のベクターが無い場合には、様々なベクターを共通の部位で制限酵素消化し、適当なフラグメントを単離して自体既知の方法で再結合(リライゲーション)することにより所望のDNAを組立てる。既知のリガンドに対するリセプターを同定するための他の方法は当業者にとって既知であるか、将来、利用可能となり得る。

推定のリセプターは同定されたかもしれないが、インビボにおけるそのリガンドはなお不明である。例えば、脳下垂体や副腎の如き腺から得られる内分泌組織の研究によって、構造上、他の既知のリ

セプターと似ている膜結合タンパク質(即ち、大きい(通常500残基以上)細胞外領域、疎水性のトランスメンブラン配列およびカルボキシ末端である細胞質領域とを有するであろう)が同定されるかもしれない。同様に、悪性腫瘍細胞のリセプター検索は、形質転換された表現型と関連しているかもしれない。高濃度に存在している特異なリセプター類を同定するのににも有用であろう。その様なリセプターの細胞外領域も、本発明にとって有用である。

リセプターとそのリガンドは同定されたが、細胞質領域は既知の機能を有しないかもしれない。例えば、アデニル酸シクラーゼやグアニル酸シクラーゼを活性化することも、ホスホトランスフェラーゼ活性を有することも、リガンドを輸送することも分かっていないかもしれない。天然のリセプターにおいては、リガンド-リセプター相互反応により、検出可能なシグナルは全く、あるいは僅かしか産生されないにもかかわらず、ハイブリッド構築においてはリポーターポリペプチドから検

ター等のリセプター由来の細胞質性ホスホトランスフェラーゼを用いることが好ましい。しかしながら、 $\beta$ -アドレナリン作動性リセプター、アセチルコリンリセプター、およびアドレナリンリセプター等の他のリセプターも、アデニル酸シクラーゼやグアニル酸シクラーゼの活性化または阻害を介して中間体形質導入分子として作用するGタンパク質と称されるタンパク質と結合することが分っている。その様なタンパク質は単離され、特性化されている。リポーターポリペプチドとして、その様なリセプターのGタンパク質結合領域を用いることも本発明の範囲に含まれる。ヘテロログスなリセプターやリセプター同族体の細胞質領域全てを使用する必要はなく、所望の機能を示す部分のみを使用すればよく、また、他のリセプターの無効で修飾されていない配列を用いる必要もない。例えば、リガンド結合領域が得られたリセプターの細胞質内領域のアミノ酸配列における変異体や誘導体も許容される。

本発明は、機能についての特定の理論に制限さ

出可能なシグナルが供給されるので、その様なリセプターのリガンド領域は有用である。この様に、ある種のリセプターの場合には、リセプターと結合した候補薬物が非特異的に結合しているか、あるいはそれがアゴニストまたは拮抗体として作用するか否かを決定することも、生物学的に活性な、固有のリガンドを分析することも、リポーターポリペプチドなしではできない。

リポーターポリペプチドはリガンド結合部位にとってヘテロログスなポリペプチドであって、それは、リガンドが結合領域に結合した際にその性質を変化させるものであれば何でも良い。一般に、この性質の変化は、リポーターポリペプチドの酵素活性または免疫学的な同一性の変化により検出し得る。通常、リポーターポリペプチドはヘテロログスなリセプター、あるいはリセプター類似体の細胞質領域であり、例えば、リガンドとの結合に際して免疫学的または酵素学的な同一性に変化を来すことが分っている腫瘍遺伝子である。インシュリンリセプターや表皮性成長因子リセ

れるものではないが、リポーターポリペプチドの性質の変化は、リガンドによるリポーターポリペプチドに対する立体障害(例えば、リガンドが立体障害によりリポーター領域上の活性部位を吸収)によって起こされるものではないと考えられる。本発明で用いる方法はリセプターのシグナル導入機構(シグナル・トランスデューシング・メカニズム)を統制することによりリガンド結合領域の変化が分子中の立体配座における変化によってリセプター分子からリガンド領域に伝えられ、その変化がリポーターの細胞質領域の機能または性質に影響を及ぼすものである。この導入機構は、リポーターポリペプチドがリガンド結合領域にとってヘテロログスなものである場合にも有効であることが分った。

所望により、ハイブリッドリセプターは、リガンド結合領域とリポーターポリペプチドとの間に融合されているトランスメンブラン配列を含んでいてもよい。典型的なトランスメンブラン領域は、約20~25残基を含有し、約1.5から3.5に



ヒドロパシピークを示すものである。それらは疎水性の側鎖を有する残基、例えばロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンおよびメチオニン等を高い割合で含有している。適切なトランスメンブラン配列は細胞外のリガンド結合領域を供給するリセプターから得られるが、トランスメンブラン配列は全合成されるか、あるいは膜内在性タンパク質または非関連リセプターから得ることができる。最後の例には、ヘテロローガスなリセプターの細胞質内領域であるリポーターポリペプチドに通常伴っているトランスメンブラン領域も含まれる。

ハイブリッドリセプター成分は、ヒト、動物、植物、昆虫、さらに原虫、ウィルスおよび真菌を含む微生物、並びにその他の適当な種を起源とする。リガンド結合領域の供給源となる種は、関心を持たれているリガンドと結合し得るリガンド結合領域の存在について、あるいは、標的となっている生理活性の存在について選択される。リポーターポリペプチドまたはトランスメンブラン領域

する核酸を含有している。通常、これはそのアミノ末端に分泌シグナルが結合している成熟した形のハイブリッドリセプターをコードしているDNAであろう。この分泌シグナルは、リガンド結合領域の得られたリセプターの分泌を指令する通常のシグナル配列であることが好ましい。しかしながら、他のリセプターに由来するシグナルや、同一種または近縁種の分泌ポリペプチドから得られるシグナルも適当なシグナルとなり得る。

分泌されたハイブリッドは、それがトランスメンブラン領域を含んでいれば、組換え宿主の膜内に位置する。その様な領域がハイブリッド中に存在しないときには、ハイブリッドは培養培地に分泌される。通常、ハイブリッドは、構造を可能な限り忠実に保持するために、トランスメンブラン領域を含有していることが好ましい。しかしながら、ハイブリッドリセプターを、他の細胞膜タンパク質を含まないように精製しなければならない膜結合性リセプターの場合よりも、トランスメンブラン領域を欠失したリセプターの精製の方が

を、リガンド結合領域と同一種から得る必要はない。

ハイブリッドリセプターは一般に、今日、技術分野で利用可能なインビトロの方法で実用的に合成するには、あまりにも大きく複雑なので組換え細胞培養法で合成することが好ましい。

ハイブリッドリセプターを合成するための組換え法は、ハイブリッドリセプターをコードしている核酸を含有する複製可能なベクターの組立てから始まる。一般に、ベクターは適合し得る宿主細胞と共同して2つの機能を果たす。1つの機能はハイブリッドリセプターをコードしている核酸のクローニングを促進すること、つまり、使用可能な量の核酸を生産することにある。もう一つの機能はハイブリッドリセプターの発現を指令することにある。これらの機能の一方または両方が、ベクター-宿主系によってなされる。ベクターは、選択された宿主細胞と同様、それがなすべき機能に応じて異なる成分を含有することとなる。

各ベクターはハイブリッドリセプターをコード

複雑でない。さらに、細胞-結合性リセプターの場合、増殖期に細胞膜に多量の蓄積が起きると、宿主に望ましくない生物学的な影響を与えるかもしれない。これらの潜在的な可能性は、ハイブリッドリセプターをコードしているアミノ酸を誘導可能なプロモーターのコントロール下におくことによって克服される。

クローニングベクター中では、通常、ハイブリッドリセプターをコードしている核酸は、選択された宿主内で、宿主の染色体と独立してベクターを複製させる核酸配列と一緒に存在している。通常、この配列は、複製起源または自律的複製配列である。その様な配列は、種々の細菌、酵母およびより高等な真核細胞についてよく知られている。よく知られたプラスミドpBR322の複製起源は大腸菌に、2μプラスミドの複製起源は酵母に、そして種々のウィルス(SV40ウィルス、ポリオマウィルス、アデノウィルスまたはウシ乳頭腫ウィルス)の複製起源は哺乳類細胞に適合する。余り望ましくないが、DNAは、宿主のゲノムに

挿入されることでクローンされる。このことは、例えば、バシラスのゲノムDNAと相補的なベクターDNAに挿入することにより、バシラス種では容易に行い得る。このベクターでバシラスがトランスフェクションされると、ゲノムとのホモロジーな組換えが起き、ハイブリッドリセプターDNAが挿入される。しかしながら、ハイブリッドリセプターをコードしているゲノムDNAの回収は、ハイブリッドリセプターDNAをクローニングビヒクルのゲノムから回収するために制限酵素による消化を行う必要があるため、外的に複製されたウィルスDNAまたはプラスミドDNAの回収よりも複雑である。

発現およびクローニングベクターは選択遺伝子(選択可能なマーカーとも称される)を含有していなければならない。これは、ベクターで形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードしている遺伝子である。この遺伝子が存在することにより、挿入体を発現する宿主のみが確実に増殖することになる。代表的な選択遺

マーカーを与える。酵母宿主細胞ゲノムに $trp1$ 損傷があると、トリプトファンの非存在下で形質転換体を増殖させることで形質転換を検出するのに有効な環境が得られる。同様に、 $Leu2$ 欠損酵母株(ATCC 20,622または38,626)は $Leu2$ 遺伝子を有する既知のプラスミドで補償される。

哺乳類細胞にとって適当な選択マーカーは、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、チミンキナーゼまたはネオマイシン耐性を付与するタンパク質である。その様なマーカーにより、ハイブリッドリセプター核酸を取り入れるのに適した細胞を同定することが可能となる。哺乳類細胞形質転換体を、マーカーを取り込んだ形質転換体のみが特異的に生存に適応し得る選択圧の下におく。選択圧は、培地中の選択物質の濃度が逐次増加されている、連続的な細胞培養中で培養することにより、選択遺伝子をコードしているDNAとハイブリッドリセプターをコードしているDNAの両者を増殖させることにより与えられる。増殖され

た遺伝子は、(a)抗生物質あるいは他の毒素(例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートまたはテトラサイクリン)に対する耐性を付与する、または(b)栄養要求性の欠失を補償するタンパク質をコードしている遺伝子か、あるいは(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードしている遺伝子(例えば、バシラスにとっての、D-アラニン・ラセマーゼをコードしている遺伝子)である。

酵母内で用いるのに適した選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7中に存在する $trp1$ 遺伝子である[スティンチコムら(Stinchcomb)、1979 "ネイチャー(Nature)" 282:39; キングスマンら(Kingsman)、1979 "ジーン(Gene)" 7:141; またはチエンパーら(Tschenper)、1980 "ジーン" 10:157]。 $trp1$ 遺伝子はトリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株(例、ATCC No. 44076またはPEP4-1[ジョーンズ(Jones)、1977 "ジェネティクス(Genetics)" 85:12])に選択マ

ーカーをコードするDNAにより、ハイブリッドリセプターの合成量が増加される。

例えば、DHFR形質転換細胞は、ヒポキサンチン、グリシンおよびチミジンに欠く培養培地中で選択される。この場合、適当な宿主細胞はウーラウブ(Urtaub)およびチャッシン(Chasin)1980、"プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(プロナス)(Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA)" 77:4216記載の如くにして調製し、増殖された、DHFR活性を欠くチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)セルラインである。

メトトレキセート(MTX)耐性の高い突然変異DHFRが特に有用なDHFRである(EP117,060A)。この選択物質は、内因性のDHFRが存在していても、それ以外において適切な宿主であれば用いることができる。内因性のDHFRを完全に不活化するには、単に、充分量のMTXが培地中に含有されていればよく、そうすれば、MTX選択は、突然変異DHFRのDNAの増幅

によってのみ行われる。MTXを転写することのできる真核細胞の大多数はメトトレキセート感受性のように思われる。その様な有用なセルラインの1つに、ある種のCHOライン、即ちCHO-K1(ATCC No. CCL61)がある。

ハイブリッドリセプターを脊椎動物の組換え細胞培養中で合成するのに適応させ得る他の方法、ベクターおよび宿主細胞は、グッシングら(M. J. Gething)、"ネイチャー" 293:620~625(1981)、マンティラ(N. Mantel)、"ネイチャー" 281:40~46およびレビンソンら(A. Levison)、EP11706,058Aによって記載されている。

発現ベクターは、クローニングベクターと異なり、ハイブリッドリセプターをコードしているDNAが強く転写されるよう、宿主生物によって認識される、プロモーターおよび/または他の配列を含有していなければならない。これは、一般に、意図する宿主のプロモーターとホモロガスな配列である。高等な真核細胞の場合、プロモーター

ベクター中のハイブリッドリセプターをコードしているDNAと機能的(操作可能)にライゲート(結合)させることができる[シーベンリストら(Siebenlist)1980"セル(Cell)" 20:269]。原核生物系で用いるためのプロモーターには、ハイブリッドリセプターをコードしているDNAと機能的に結合しているシャインデルガルノ配列も含まれるであろう。

酵母用ベクターの好適なプロモーティング配列には、以下のものに対するプロモーターが含まれる:メタロチオナイン(metallothionein)、3-ホスホグリセレート・キナーゼ[ヒッツマン(Hitzman)ら、1980"ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ" 255:2073]またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベート・デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェート・イソメラーゼ、3-ホスホグリセレート・ムターゼ、ピルベート・キナーゼ、トリオセホスフェート・イ

からの転写をより増大する上で、エンハンサー配列が有用である。プロモーターと異なり、エンハンサー配列は、ハイブリッドリセプターをコードしている核酸の5'側に位置している必要はない。原核生物に一般的に用いられるプロモーターには、β-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系[チャンら(Chang)、1978"ネイチャー" 275:615;ゲツデルら(Goeddel)、1979"ネイチャー" 281:544]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[ゲツデル1980"ヌクレイック・アシッド・リサーチ(Nucleic Acids Res.)" 8:4057およびEPO出願公開No. 36,776]、並びにlacプロモーター[ドゥ・ボアら(H. de Boer)、1983"プロナス USA" 80:21-25]の如きハイブリッドプロモーターが含まれる。しかしながら、他の既知の微生物のプロモーターも適する。それらのヌクレオチド配列は公開されているので、当業者は、必要な制限部位を与えるリンカーやアダプターを用いて、それらをフラスミド

ソメラゼ、ホスホグルコース・イソメラーゼ、グルコキナーゼ等の他の解糖酵素類[ヘス(Hess)ら、1968、"ジャーナル・オブ・アドバンスト・イン・エンザイム・レグ(J. Adv. Enzyme Res.)" 7:149;およびホルランド(Holland)ら、1978、"バイオケミストリ" 17:4900]。

その他、増殖条件によって転写がコントロールされるという利点をも有するプロモーターとして、アルコール・デヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連する減成酵素、前記メタロチオナイン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ、並びにマルトースおよびラクトースの利用に与る酵素類等に関するプロモーター領域が含まれる。更に、酵母内で発現させる上で好適なベクターおよびプロモーターはR. ヒッツマン(R. Hitzman)らにより、EPO公開番号第73,657号の中に記述されている。

哺乳類宿主細胞内でのベクターからの転写は、

ウシ乳頭腫ウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび大多数の好ましいシミアンウイルス40(SV40)から得られ、ハイブリッドリセプターの核酸と機能的に結合しているプロモーターおよび/またはエンハンサーによってコントロールされる。SV40ウイルスの早期および後期プロモーターはSV40ウイルスの複製起源を含有しているSV40制限フラグメントと同様、都合良く得られる[ファイヤーズら(Fiers)、1978 "ネイチャー" 273:113]。本発明においては、宿主細胞またはその近縁種から得られたプロモーターやエンハンサーも有用であることは当然である。

核酸は、それが他の核酸配列と機能的な関連性に置かれている場合、機能的に結合していることになる。例えば、プレ配列または分泌リーダのためのDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するブレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドのDNAと機能的に結合しており、

発現にとって好適な宿主細胞は、原核細胞、酵母細胞およびより高等な真核細胞である。原核細胞には、大腸菌やバチラスの如き、グラム陰性またはグラム陽性菌が含まれる。好ましいクローニング宿主は大腸菌294(ATCC31446)であるが、大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31537)、大腸菌W3110(ATCC27325)、シュドモナス種、あるいはセラシア・マーセサンス(*Serratia Marcescens*)も適する。

原核生物に加えて糸状菌や酵母の如き真核微生物もハイブリッドリセプターをコードしているベクターの宿主として適する。下等な真核性宿主微生物の内、サッカロミケス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)または通常のパン酵母が最も普通に用いられる。しかしながら、他の多くの菌、種または株も一般に入手可能であり、本発明に用い得る。

機能的なハイブリッドリセプターの発現にとって好適な宿主細胞は多核細胞生物から導かれた細

プロモーターまたはエンハンサーは、それが暗号配列の転写を左右するならば該配列と機能的に結合しており、あるいは、リボソーム結合部位は、それが暗号配列の翻訳を促進するよう位置せしめるならば該配列と機能的に結合していることになる。一般に、機能的に結合しているという言葉は、結合されているDNA配列が近接しており、さらに、分泌リーダ配列の場合には、近接し、リーディングフレーム内にあることを意味する。

真核性宿主細胞(酵母、菌類、昆虫、植物、動物またはヒト)内で用いる発現ベクターは転写の終止およびmRNAの安定化に必要な配列をも含有しているであろう。その様な配列は、一般に、真核性の、またはウイルスのcDNAの3'非翻訳領域から得られる。これらの領域は、ハイブリッドリセプターをコードしているmRNAの非翻訳部分に含まれるポリアデニル化セグメントとして転写される領域を含有している。この3'非翻訳領域には転写終止部位も含まれている。

本発明におけるベクターのクローニングまたは

細胞の培養物である。多くの場合、ハイブリッドリセプターは下等な微生物には適合し得ない領域、即ち、適切なジスルフィド結合を形成する上で複雑なプロセッシングを必要とし、しばしば、サブユニット・プロセッシングが要求される疎水性の領域、を含有している。しかも、このリセプターのグリコシル化は天然のリセプターの場合と同様に行われることが望ましい。これらの機能は全て高等な真核細胞により、最もよく達成される。原則として、脊椎動物または無脊椎動物の細胞培養物のいずれでもよく、あらゆる高等な真核細胞の培養物が有用であるが、ヒト等の哺乳類の細胞が好ましい。培養中でのその様な細胞の増殖は自体既知である[組織培養(Tissue culture)、アカデミック・プレス、クルス(Krus)およびバターンソン(Patterson)編(1973)参照]。有用な哺乳類宿主のセルラインには例えば、VERO細胞、Hella細胞、チャイニーズハムスターの卵巣細胞セルライン、W138、BHK、COS-7およびMDCKの各セルラインが含まれる。

本発明のハイブリッドリセプターは、原則として、該リセプターを被検試料、コントロールおよび(所望により)スタンダード(標品)と一緒にインキュベートした後、リポーターポリペプチドにおける変化を測定することからなる方法により、薬物のスクリーニング、あるいは生物活性なリガンドのアッセイに用いられる。リガンドの結合がリポーターポリペプチドの立体配座を変化させることは、本発明者らが見出したことである故、この様な変化を幾つかの方法のどれかを用いて検出することも本発明の範囲内に含まれる。一般に、リポーターポリペプチドのタンパク質結合または酵素活性の変化を測定する。一つの方法では、活性化された立体配座に対する抗体を遊起させ、リセプターをリガンドまたは候補薬物と一緒にインキュベートしてから、ハイブリッドリセプターに対する抗体の結合を測定する。このアッセイは従来のタンパク質抗原についてのイムノアッセイと同様の方法で行われる。抗体はホスホチロシン含有タンパク質と結合し得ることが自明である

合を利用するアッセイと同様の方法は、正常な相互作用によってリポーターと結合する非-免疫的な結合タンパク質のリポーターへの結合を測定する方法である。典型的な結合タンパク質は、ある種の、リガンドで活性化されたリセプターに伴っているGタンパク質である。この場合のリポーターポリペプチドは $\beta$ -アドレナリン性リセプター等のリセプターの細胞質内領域である。Gタンパク質の結合は、標識したGタンパク質の置換により、あるいは、活性化されたGタンパク質へのGTPまたはATPの結合の測定等、抗体結合のアッセイと同様にして分析される。

もしもリポーターポリペプチドがヘテロログスなリセプターの酵素学的に活性な細胞質内領域である場合には、その活性のアッセイが検出方法として好ましい。今日、その様な活性には、タンパク質のホスホリルキナーゼ活性や一次チロシンキナーゼ活性が含まれるが、いくつかの例では、セリンキナーゼ活性やスレオニンキナーゼ活性も含まれる。キナーゼ活性は、従来のキナーゼ活性

[ウオン(Wang)、1985 "モル・アンド・セル・バイオロ(Mol. and Cell. Biol.)" 5(12):3640-3643;ロスら(Ross)、1981、"ネイチャー" 294:654;およびパンら(Pang)、1985、"アーキ・バイオケム・バイオフィス(Arch. Biochem. Biophys.)" 242(1):176]。これらの抗体は本発明の方法に有用であるが、従来技術における抗体と異なり、ハイブリッドリセプターの場合には、リポーターポリペプチドにとって特異的であり、他のリセプターやりん酸化されたタンパク質とは交差反応せず、リガンドのリセプター結合領域への結合影響を測定することに関しては、まさに利用度の高い抗ホスホチロシン抗体が選ばれる。しかし、この方法は、結合しなかった標識抗体をリポーターと結合した抗体から除去するために相分離が必要であるという不都合を有する。しかしながら、この方法では、ハイブリッドリセプターを共有結合的に修飾しなくともよい。

リポーターポリペプチドに対する特異抗体の結

の測定法の内、いずれかの方法によって測定される。キナーゼ活性の測定法として、本発明において好ましい従来方法は、 $^{32}\text{P}$ を用いた自己りん酸化を介する、リポーターポリペプチドへの放射性りんの挿入を測定する方法である。同じ種類の活性を有するリセプターのハイブリッドを形成することが好ましい。

しかしながら、酵素学的な活性やポリペプチドの相互作用以外の手段でリポーターポリペプチドの変化を測定することも本発明の範囲に含まれる。その様な方法の一つは、リガンドとの結合に際して性質が変化する有機部分をリセプターに結合させることを含む。例えば、リポーターポリペプチドを安定なフリーラジカルや化学発光性の基、あるいはフルオレスセイン・イソチオシアナートの如き蛍光性の分子でラベルする。これらのラベルはいずれも診断的免疫化学の分野では良く知られており、それらをタンパク質と共有結合的に結合させるための常法も良く知られている。これらの方法はリポーターポリペプチドを他のタンパク質

と同様の方法でラベルするのに有用である。リガンド結合領域に対するリガンドまたは検知薬物の結合に際するリセプターポリペプチドの立体配座の変化はラベルの変化に基づいて検出される。例えば、リポーターポリペプチドの立体配座に対するリガンドの活性化に基づく変化によって安定なフリーラジカル・ラベルの回転モーメントが増加または減少するであろう。同様に、リポーターポリペプチドの蛍光性ラベルまたは化学発光性ラベルは、リポーターポリペプチドにリガンドまたは活性な検知物が結合すると分子内のエネルギーの移動に関与しているポリペプチド種が再配向(リオリエンテーション)されるために変化するであろう。これは、ラベル分子の強度、分極または波長の変化によって検出され、一般に、ラベルの蛍光または化学発光の増強または消失によって検出される。ラベルしたリポーターを用いる方法の利点は、リガンドまたは検知薬物の分析をもっぱら水溶液中で行うことができ、相分離の必要がないことにある。このことにより、オートアナライザー

様々な制限酵素は市販されており、その反応条件、コファクター、およびその他必要なものは、酵素の供給業者の指示に従って使用した。制限酵素類は、各制限酵素が最初に得られた微生物を表示する大文字、次いで他の文字、更に、通常、数字からなる略号で表わされる。特定の酵素について適当な緩衝液および基質の量は、製造業者によって明示されている。通常、インキュベーション時間は37℃で1〜数時間とするが、供給者の指示に従ってかえてもよい。インキュベーションした後、フェノールおよびクロロホルムでタンパク質を抽出して除き、水性フラクションからエタノール沈殿によって消化された核酸を回収する。時たま、制限酵素による消化の後、5'末端のホスフェートを細菌性アルカリホスファターゼで加水分解することがある。これは、DNAフラグメントの2つの制限的開裂末端が"閉鎖(サーキュライディング)"したり、閉じたループを形成することにより、該制限部位に他のDNAフラグメントが挿入されにくくなるのを防止するためである。明示しない

等の連続フロー機器を用い、自動的なスクリーニング法が可能となる。その様な方法は、ハイブリッドリセプター同様、固有のリセプターにも有用である。

実施例の記載を簡単にするため、頻繁に用いられる方法を短い熟語に略して示す。

"プラスミド"は小文字のpを先頭にし、そして/または大文字および/または数字を続けることによって表わされる。本発明の出発物質であるプラスミドは市販されているか、または非制限的な施設から一般に入手可能であり、あるいはこの様にして入手し得るプラスミドから、公知の方法に従って組立てることができる。更に、その他の同等なプラスミドも当業者には知られており、通常の技術者にとって自明であろう。

DNAの"消化"または"開裂"とは、DNAを、該DNAのある位置に対してのみ作用する酵素で断片的に開裂することを指す。その様な酵素を制限酵素と称し、該酵素にとって特異的な部位を制限部位(サイト)と称する。本発明において用いる

限り、プラスミドの消化には、5'末端の脱りん反応は伴わないものとする。脱りんの方法および試薬は常法に従う[T.マニアティス(T. Maniatis)ら、1982、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)pp.133-134]。

"充填(フィリング)"または"平滑末端化(ブラントニング)"とは、制限酵素で開裂した核酸の粘着末端の一本鎖末端を二本鎖に変換する工程を指す。このことにより、粘着末端が消滅して平滑末端が形成される。この工程は、1個またはほんの少数の他の制限酵素によって作られた末端とのみ結合し得る制限的な切断末端を、あらゆる、平滑に切断する制限エンドヌクレアーゼで形成された末端末端または他の充填後の粘着末端に適合し得る末端に変える上で多方面に利用可能な手段である。一般に、平滑末端化は、目的とするDNA 2〜15μgを、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント8単位と4種類のデオキシヌクレオチドトリホスフェート各250μMの存在下、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mMジチオトレイトール、50mM

NaCl、10 mM トリス(pH 7.5)バッファの混液中、37℃でインキュベートすることにより行われる。通常、30分後にフェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿に付すことによりインキュベーションを終了する。

制限消化物からの特定のDNAフラグメントの“回収”または“単離”とは、この消化物をポリアクリルアミドゲルまたはアガロースゲル電気泳動にかけて分離し、フラグメントの移動度を分子量既知のマーカーDNAフラグメントのそれと比較して所望のフラグメントを同定し、所望のフラグメントを含むゲルの部分を取り除き、該ゲルからDNAを分離することを意味する。この方法は一般的に知られている。例、R.ローン(R. Lawn)ら、1981、“ヌクレイック・アシッド・リサーチ”9:8103-8114およびD.ゲツデル(D. G. oeddel)ら、1980“ヌクレイック・アシッド・リサーチ”8:4057参照。

“形質転換”とは、DNAを生物内に導入することを意味し、その結果DNAが染色体外成分とし

アクリルアミドゲル上で精製されたものである。

以下の実施例は本発明を実施する上で、現在知られている最良の方法を例示するものにすぎず、本発明がこれらに限定されることはない。

本明細書中で引用した文献は全て参照例として示されている。

**実施例 1** インシュリンリセプター(IR)発現プラスミドの組立て

全HIR暗号配列を含有するλHIR-P12から得たゲル精製SalIフラグメント(5.2 kb)を、pUC12をSalIで消化し、このベクターに精製SalIフラグメントをライゲートすることによりpUC12[ニューイングランド・バイオラボス(New England Biolabs)]のポリリンカー領域にサブクローンした。コロニーを増殖させ、pUC12 XbaI部位の隣にHIR暗号配列の5'末端が所望の方向性で含有されているクローンをスクリーニングした。このベクターをXbaIおよびDraIで消化し(DraIはHIRの3'非翻訳領域に含まれている)、HIR-含有フラグメント

で、あるいは染色体内に組み込まれて複製されることを意味する。特に明示しない限り、本発明における大腸菌の形質転換法にはマンデル(Mandel)らのCaCl<sub>2</sub>法(1970、“ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジイ”53:154)を採用する。

“ライゲーション(結合)”とは、2個の2本鎖核酸フラグメントの間にホスホジエステル結合を形成する工程を言う(T.マニアティスら、前掲p146)。特に明示しない限り、ライゲーションは既知の緩衝液と条件を使用し、ライゲートすべきDNAフラグメント1μg当たりT4 DNAリガーゼ(“リガーゼ”)10単位を用いて行う。

形質転換体からDNAを“調製する”とは、プラスミドDNAを微生物培養物中から単離することを意味する。明示しない限り、マニアティスらのアルカリ性/SDS法(同上p.90)を採用する。

“オリゴヌクレオチド”とは、短かい一本鎖または二本鎖ポリデオキシヌクレオチドであって、既知の方法によって化学的に合成され、次いでポリ

を単離した。このフラグメントを哺乳類の発現ベクター(pCVSV-EHBVE400、欧州公開No.117,060)であって、BamHIで先に消化しておいたベクターに挿入した。BamHI粘着末端を充填した後、プラスミドをXbaIで消化した。従って、XbaI-DraIへの挿入は、HIR-IRNAが必然的に発現する方向にのみ可能であった。得られたインシュリンリセプター発現プラスミドをpCVSV-HIRcと命名した。

**実施例 2** インシュリン-EGFハイブリッドリセプターを発現させるためのベクターの組立て

以下のフラグメントを、4成分(ファクター)ライゲーションでライゲートさせた。(a)IR発現プラスミドpCVSV-E-HIRc由来の931bp BamHI-AatII制限フラグメント、(b)組換えファージλHER-A64[ウーリッチら(Ullrich)1984、“ネイチャー”309:418~425]に含有されているヒトEGFリセプター配列の1150bpApaI-SstI制限フラグメント、

(c) 5'-CCCGTCAAATATCGCCAC  
TGGGATGGTGGGGGCC-3'および  
5'-CCCACCATCCCAGTGGGA  
TATTTGACGGGAGGT-3'を含有す  
る合成オリゴヌクレオチドリンカー、および(d)  
Sst I および Bsa H I で開裂された pUC 12。  
この様にして、インシュリンリセプターの細胞外  
領域をコードしている配列を EGF リセプターの  
トランスメンブラン領域および細胞質領域をコー  
ドしている配列と結合させ、発現プラスミド内に  
位置せしめた。ハイブリッドをコードしている D  
NA を含有するプラスミド pUC 12 / HIR-  
HER int. を形質転換された大腸菌 294 のア  
ンピシリン耐性コロニーから回収した。このプラ  
スミドを Bsa H I および Apa I で消化し、IER  
連結部(ジャンクション)を含有する 965 bp フラ  
グメント(フラグメント 1)を回収した。pCVS  
V-HIRc を Pvu I および Bsa H I で消化し、  
残りの I R 番号配列と哺乳類発現ベクターの一部  
を含有する 3117 bp フラグメント(フラグメン

セプター下流のトランスメンブラン領域が M13  
突然変異誘発によって欠失されており、欠失され  
た ER フラグメントにフレーム内で、Apa I アダ  
プターがライゲートされていることを除き、pC  
VSV-HIRc を用いて同様の方法で組立てた。

インシュリンリセプター  $\alpha$  鎖と EGF リセプタ  
ーのトランスメンブランおよび細胞質領域とのハイ  
ブリッドであって、HIR- $\beta$  鎖配列を全く含  
まないハイブリッドリセプター-I $\alpha$ ER をコード  
しているベクターを IER プラスミドのオリゴヌ  
クレオチドで指令される欠失突然変異により調製  
した。結合したインシュリンリセプターおよび E  
GF リセプターの配列を M13 mp10 ベクターの  
Bsa H I 部位に導入した。M13 mp10 の Hind  
III 部位の隣りに所望の方向性で I R 配列を含有し  
ている分子を同定し、アデルマン(Adelman)ら["  
DNA" 2:183~193(1983)]のプロト  
コールに基づき、オリゴヌクレオチド 5'-CC  
CCAGGCCATCTATCGCCACTGG  
GA-3'を用いた欠失突然変異誘発を行うため

ト 2) を回収した。λHER-A64 を Apa I -  
Bgl II で消化して 810 bp フラグメント(フラグ  
メント 3)、Bgl II-Xba I で消化して 1 kb フラ  
グメント(フラグメント 4)をそれぞれ回収した。  
フラグメント 3 および 4 は ヒト EGF リセプター  
のトランスメンブランおよび細胞質領域をコード  
している。pCVSVEHBVE400 を Bsa H  
I で消化し、制限部位を末端の充填に付し、この  
DNA を引き続き Pvu I で消化した。記載の哺乳  
類発現ベクターの一部をコードしている 4 kb Bsa  
H I-Pvu I フラグメント(フラグメント 5)を回  
収した。フラグメント 1、2、3、4 および 5 の  
混合物をライゲートし、大腸菌 294 DNA の形  
質転換に用いた。制限分析によりアンピシリン耐  
性コロニーをスクリーニングした。HIR-HE  
R 連結部とオーバーラップする 241 bp の Pst I フ  
ラグメントを M13 Tyl3 I にクローンし、配列  
決定を行って予測される連結部を立証した。

トランスメンブラン領域を含有しないハイブリ  
ッドリセプターの発現ベクターを、Apa I EGF リ

に、一本鎖の鋳型を調製した。りん酸化したブラ  
イマー 50 ng を一本鎖 M13 鋳型 2  $\mu$ g とハイブ  
リダイズさせた。突然変異した第 2 の鎖を完成さ  
せ、この二本鎖分子を大腸菌 JM101 に導入し  
た。得られたブランクを、ハイブリダイゼーショ  
ンのプローブとしてプライマーを用い、高いスト  
リンジエンシィの下、ベントン(Benton)および  
デービス(Davis)の"サイエンス"198:180  
~182(1977)記載の方法に従い、スクリー  
ニングした。二本鎖 DNA を調製し、突然変異し  
た領域を含有する 1.2 kb Bst E III 制限フラグメ  
ントを用いて IER 発現プラスミドのそれぞれの  
DNA フラグメントと置換し、pI $\alpha$ ER を得た。

**実施例 3** インシュリンおよび EGF のハイ  
ブリッドリセプターの発現

COS-7 サル腎細胞[グルツマン(Gluzman)  
1981, "セル" 23:175~182]を 10%  
ウシ胎児血清と抗生物質とを含んだ、DMEM 培  
地と F12 培地の 50:50 混合物中で培養した。  
全細胞培養培地[ギブコ(Gibco)]は、2 mM L



ーグルタミンと20mMHEPES pH7.4を含  
有していた。

実施例2で得たpI ERまたはpI α ERをグラ  
ハム(Graham)およびファン・デル・エブ(Van  
der Eb)、1973 "ヴィロロジィ(Virology)"  
52:456~467のプロトコールに基づき、  
りん酸カルシウムによる共沈法によってCOS-  
7細胞に導入した。単(サブ)全面成長した細胞を  
8cxの培養皿あたり、10μgのプラスミドでト  
ランスフェクトした。プラスミドDNAを1mM  
トリス pH7.5、0.1mMEDTA、および25  
0mM CaCl<sub>2</sub> 0.55μlに溶かした後、50mM  
HEPES pH7.12、280mM NaClおよび1.  
5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5μlをゆっくり加えた。4  
5分間の間に沈殿が徐々に形成され、それを、細  
胞培養培地に加えた。トランスフェクトされたC  
OS-7細胞を、抗生物質、2mM L-グルタミ  
ン、20mM HEPESおよび10(v/v)%ウシ  
胎児血清(pH7.4)を含んだDMEM培地とF-  
12培地の50:50混合物中、37℃で53時

#### ん酸化

pI ERまたはpI α ERで形質転換した、並び  
にmock形質転換に付されたCOS-7細胞を8cx  
の培養皿中で53時間増殖させて得た単層あるい  
はA431細胞をPBSで2回洗浄し、クリス  
(Kris)、1985 "セル" 40:619~625の  
記載の如くにして可溶化した。150mM NaCl、  
1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1mMEDTA、10%グリセ  
ロール、1%トリトンX-100、1%アプロチ  
ニン(シグマ)および4μg/μlフェニルメチルス  
ルホニル・フルオライド(PMSF)(シグマ)並び  
に0.5μg/μlバシトラシン(シグマ)を含有する  
50mM HEPESバッファー(pH7.5)1μlを、  
この単層に4℃において5分間加えた。培養皿か  
ら、可溶化されたタンパク質を含有しているバッ  
ファーを取り、4℃において5分間、10,00  
0gで遠心した。トランスメンブラン領域を欠失  
したハイブリッドリセプターで形質転換した細胞  
の培養上清を4℃において5分間、10,000g  
で遠心した。細胞溶解液または培養上清0.2μl

固培養した。

pI ERまたはpI α ERで形質転換されたCO  
S-7細胞をPBSで2回洗浄し、2.2cxのウ  
エルあたり、0.2%ウシ血清アルブミン(シグマ)  
、バシトラシン(0.5μg/μl、シグマ)および<sup>125</sup>  
Iインシュリン(0.5μCi/ウエル)、93μC  
i/μgを含んだ血清不含細胞培養培地1μl中、2  
1℃で2時間インキュベートした。細胞を、4℃  
において、PBSで3回洗浄し、37℃において、  
0.1%SDS、0.1M NaOH 0.5μl中で30  
分間溶解させた。ガンマ・カウンター中で放射活  
性を測定した。形質転換体へのインシュリンの結  
合が、対照におけるそれよりも増加していること  
を、第2a図に示した。

ヒト上皮性腫瘍細胞A431(EGFリセプタ  
ーの対照リセプター供給源)を1μlあたり4.5mM  
グルコース、10%ウシ胎児血清および抗生物質  
を含んだDMEM中で培養した。

実施例4 正常なリセプターおよびハイブリッ  
ドリセプターにおけるホルモン刺激下での自己リ

を200nMインシュリン(シグマ)または1μM  
EGFと1時間インキュベートした。

インシュリンリセプターと結合し得るマウスの  
モノクローナル抗体[C#25.3、ガングリイ  
(Ganguly)1985 "細胞制御における今日の話題  
(Current Topics in Cellular Regulation)"  
27:83-94]をプロテインA-セファロー  
スに吸着させて固定化した。しかしながら、どの  
様なポリクローナルまたはモノクローナル抗-イ  
ンシュリンリセプター抗体を用いても良いことは、  
理解できるであろう。抗体1μlを、界面活性剤  
不含の溶解バッファー中、膨潤させ、予め洗浄し  
ておいたプロテインA-セファロース(1:1)の  
スラリーと30分間混合し、抗-IR抗体を吸着  
させた。

固定化抗-IR抗体のスラリー50μlをEG  
Fまたはインシュリンで処理した細胞リゼイト、  
あるいは細胞培養上清に加え、4℃で15分間イ  
ンキュベートした。生成した免疫沈降物をHNT  
Gバッファー(20mM HEPES、pH7.5:1

50 mM NaCl、10%グリセロールおよび0.1%トリトンX-100)0.9 mlで4回洗浄した。容量30  $\mu$ lの沈殿を5 mM NaClに調整し、15  $\mu$  Ciの $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP(5,000 Ci/mol)を4℃において0.5~10分間で加えた。ATPの終濃度は、0.1  $\mu$ M ATP(EGF、IERまたはI $\alpha$  ER形質転換体またはそれらの対照に関して)、あるいは100  $\mu$ M ATP(HIR形質転換体またはその対照に関して)であった。3倍濃度のSDS試料バッファー20  $\mu$ lを加えることにより自己りん酸化反応を終了させた。第3a及び3d図においては5分後、第3b図においては1分後、そして第3c図においては指示した時間の後に、5分間煮沸することによって自己りん酸化を終了させた。試料を遠心し、20  $\mu$ lづつ、5%/7%SDSポリアクリルアミドゲル上で分析した[ラエムリ(Laemmli)、1970「ネイチャー」277:680~685]。

SDS-PAGE還元ゲル上で得られた泳動パターンはチロシンキナーゼ配列を含有するポリペ

制御の分子側面(Molecular Aspects of Cellular Regulation)4巻、「トランスメンブランのシグナリングにおける分子機構(Molecular Mechanisms of Transmembrane Signaling)」のことは、インシュリン結合領域によってコントロールされた場合でも、EGFリセプターキナーゼは、その本来の特徴を維持することを示すものである。

驚くべきことに、インシュリンで刺激された、あるいは刺激されていないIERリセプターハイブリッドの130 kDりんタンパク質サブユニットは微妙な、しかし再現性のある、サイズの相違を示す(第3d図)。この観察結果からリガンド誘導酵素活性は、チロシン残基のりん酸化をもたらすが、基本的なレベルでの修飾を伴わず、以後に続くリセプターの細胞質内領域の立体配座上的変化によってSDSゲル内での泳動特性が変化し得るという可能性が示される。無傷のEGFリセプター内でも同様の変化が起こり得るが、170 kDグリコプロテインという大きいモノマーサイズを有す

ブチドに対する $^{32}$ S-Met標識法の結果と一致した。第3b図(HIR+)から、内因性COS-7コントロールの場合よりも、ヒトインシュリンリセプター $\beta$ サブユニットの場合の方が、インシュリン刺激自己りん酸化が高いことが分る。この場合、インシュリンリセプターキナーゼにとって必要なATPの濃度(100  $\mu$ M)に起因して、観察されるシグナルは弱い。インシュリンの誘導効果は強い。これに対し、A431細胞EGF対照リセプター(A431)で認められるように、EGFリセプターキナーゼの活性およびEGF刺激の測定にはピコモル濃度しか必要としない。キメラリセプター分子IERが特徴的に低濃度のATPを必要とすることは、そこに、EGFリセプターキナーゼが存在していることを示すものである。リガンド誘導でキナーゼの $V_{max}$ が増加され、最大誘導(4倍)は4℃において、30秒間の反応の後に認められた(第3c図)。この観察結果は野生型のEGFリセプターの動力学的特性とよく関連しており[スタロスら(Staros)1985、「細胞

るので検出されていない。電気泳動における変化は、 $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ[クレットら(Kuret)、1985「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ」260:6427~6433]、タイプII cAMP-依存性タンパク質キナーゼ[ヘミングスら(Hemmings)、1981「ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリ(Eur. J. Biochem.)」119:443~451]等の他の自己りん酸化タンパク質についても報告されている。

開裂されていないキメラプロリセプターIERはインシュリン刺激による自己りん酸化を示すので(第3bおよび3c図、IER+ゲルの頂上のバンド)、インシュリンの結合とシグナルの導入に必要な4級構造が、インシュリンリセプターのタンパク分解的プロセッシングの前に形成されているに相違なく、このことは先行文献とも一致する[ブラックシェアーら(Blackshear)、1983、「FEBS」158:243~246;リースージョーンズら(Rees-Jones)1983「バイオケミカ

ル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Comm.) 116:417~422]。インシュリンリセプターのβサブユニットとプロリセプター開裂部位が欠失された細胞外部分を有するキメラ組立て物IαERを用いた実験(第3b図、IαER比較図、+と-)によると、得られた180kdの本質タンパク質は、見かけ上インシュリンに対する結合能力を有するにもかかわらず、細胞質内キナーゼ領域に対するインシュリンの活性化能は失われていることが分った。

上記の如く、インシュリンはピコモル濃度以下のATPの存在下、インシュリンリセプターのホスホトランスフェラーゼが不活性であるような条件下で、EGFリセプターの自己りん酸化活性の程度を制御する。インシュリンリセプターをαサブユニットとβサブユニット並びにβサブユニットのアミノ末端にプロセッシングするためのシグナルを含めて、インシュリンリセプターの完全な細胞外部分を含有するハイブリッドIERに関し

子をも含有している。ネオマイシン耐性遺伝子をコードしているプラスミドで同時形質転換して選択を行い、MTX-含有培養培地中で選択することによりDNAを増幅させた。

λHER-A64(ウーリッヒら)をSacIおよびNarIで消化し、EGFリセプターの全細胞外領域とトランスメンブラン領域とをコードしている制限フラグメントを回収した。AEV-erbB(H)[ヤマトら(Yasamoto, T.)1983"セル"35:71~78]の全細胞内領域をコードしている1.7kbAhaII-StuI制限フラグメントをEGFフラグメントと一緒に、SacIとSnaIで切り開いたpUC12プラスミドにライゲートした。この組換えプラスミドを大腸菌HB101内で増幅させ、全キメラリセプターをコードしている領域を3.7kbSacI-XbaI制限フラグメント(両部位は、それぞれEGFリセプターおよびv-erbB配列の非翻訳領域に位置していた)中に取り出した。

p342E[クロウレイら(Crowley), 1983、

でのみ、ホルモンによるコントロールが認められた。リセプターのプロセッシングは、本発明の発現系で行われるようである。βサブユニットの全ての部分をも欠き、その結果、開裂シグナルを欠くキメラIαERの場合にはホルモンの影響を認めなかった。この様なIERとIαERとの構造上の相違が、シグナル導入における決定的なキメラリセプターの構造に強く影響していると考えられる。

**実施例 5** リセプター-腫瘍遺伝子ハイブリッド(HER-erbB)をコードしているベクターの組立て

V-erbB腫瘍遺伝子産物の細胞内領域とEGFリセプターの細胞外およびトランスメンブラン領域とを融合させたハイブリッドリセプター(HER-erbB、第4図)を組立てた。

このハイブリッドリセプターは、SV40の初期プロモーターのコントロール下、プラスミドから発現される。このプラスミドはメトトレキサート(MTX)耐性のための突然変異体DHFR遺伝

"モル・セル・バイオロ(Mol. Cell. Biol.)"3:44~55]をEcoRIで消化し、開裂されたプラスミドを回収した。配列:

EcoRI      SacI      EcoRI  
GAATTCGAGCTC

CTCGAGCTTAAG

を有するアダプターを開裂したプラスミドとライゲートし、ライゲーション混合物で大腸菌294をトランスフェクトし、アダプター挿入体を含有するプラスミドpCVSVE-HBSをアンピシリン耐性コロニーから回収した。

pCVSVE-HBSをSacIで部分消化し、線状のベクターフラグメント(1)を回収した。線状プラスミドをHpaIで消化し、ベクターフラグメントを回収した。

pCVSVE-HBSベクターフラグメントとハイブリッドリセプターをコードしているSacI-XbaIフラグメントとライゲートし、形質転換された大腸菌HB101コロニーから発現ベクター-pCVSV-HER-erbBを回収した。

### 実施例 6 リセプター-腫瘍遺伝子ハイブリッドの発現

発現ベクター-pCVSVE-HER-erbBを、ネオマイシン耐性を付与し得る発現プラスミドと一緒に、グラハムとファン・デア・エブ(1973)のプロトコールに基づくりん酸カルシウム共沈法により、正常なラット1線維芽細胞に同時トランスフェクトした。単全面成長した細胞を、8cmの培養皿あたり10 $\mu$ gのプラスミドDNAを用いてトランスフェクトした。DNAを1mMトリリス pH 7.5、0.1mM EDTA、250mM CaCl<sub>2</sub>、0.55 $\mu$ g/mlに溶かし、50mM HEPES pH 7.12、280mM NaCl、1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5 $\mu$ g/mlをゆっくり加えた。40分以内に徐々に沈殿が析出し、これを細胞培養培地10 $\mu$ g/mlに加えた。トランスフェクションから5時間後、細胞をPBS中20%グリセロール3 $\mu$ g/ml内で1分間インキュベートすることによりグリセリンショック処置に付した。グリセリンを洗い流した後、元の培地中で細胞をさらに培養した。

から特異的なタンパク質を免疫沈降させ、SDS還元ポリアクリルアミドゲル上で分析した。マウスのR1モノクローナル抗体[ウォーターフィールドら(Waterfield)、1982、"ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミストリー(J. Cell. Biochem.)" 20:149~161]は、内因性のラット1細胞のEGFリセプターを認識しない。HER-erbBタンパク質は、メトトレキセートによる増幅の前または後に、免疫沈降法により容易に検出された。予想通り、HER-erbBタンパク質はA431細胞内で発現される野生型のEGFリセプターよりも小さかった。A431内で極めて高いレベルにEGFリセプターが発現された場合と比較すると、増幅されたRat1細胞は、3倍少ないHER-erbBを発現するにすぎない。

ハイブリッドHER-erbBタンパク質は、<sup>125</sup>I-EGFが種々の濃度において形質転換体細胞と結合したことから、特異的なEGF結合を示した。この結合は飽和され得るものであり、10倍過剰の非標識EGFの存在下では完全に置換され得る。

選択マーカーとしてSV40初期プロモーターのコントロール下にあるネオマイシン耐性遺伝子を用いた。トランスフェクションの2日後、選択開始に際し、400 $\mu$ g/mlのゲネティシン(Geneticin)(シグマG5013)を補充した培地を用いた。次いで、ネオマイシン耐性細胞を、7%の透析したウシ胎児血清を含有し、メトトレキセート(シグマA6770)を濃度200nM、次いで1000nMに補充した培地で増殖させた。その結果、ネオマイシン耐性セルラインにおけるcDNA発現の、段階的な増幅がみられた。

形質転換体内でのハイブリッドの発現は、最初、界面活性剤によるリゼイトをヒトEGFリセプターに特異的なマウスのモノクローナル抗体R1で免疫沈降させた後、<sup>35</sup>S-メチオニンで代謝的にラベルされたタンパク質を分析することにより監視された。安定に発現されるセルラインは<sup>35</sup>S-メチオニンで代謝的にラベルされている。プロテインA-セファロースに吸着させたR1抗体により、上記の如く調製された界面活性剤によるリゼイト

全面成長したラット1培養への<sup>125</sup>I-標識EGFの結合量は個々の細胞培養中で発現されたEGFリセプターまたはキメラリセプターの量に正確に対応していた。この様に、組立てられたタンパク質は完全な機能を持ったEGF結合部位を含有しており、細胞表面に忠実に移行されていた。

### 実施例 7 EGFの刺激下でのインビトロにおける自己りん酸化

HER-erbBがインビトロでの自己りん酸化活性を有するか否かを試験するために、細胞リゼイトを上記の如くに免疫沈降させ、<sup>32</sup>P- $\gamma$ -ATPと一緒にインキュベートし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動とオートラジオグラフィーによって分析した。8cmの培養皿中で増殖させた、形質転換された細胞の単一層をPBSで2回洗浄し、クリスラ(Kris)"セル"40:619~625(1985)の記載に従って可溶化した。この単一層に50mM HEPES pH 7.5、150mM NaCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EDTA、10%グリセロール、1%トリトンX-100、1%

アプロチニンおよび  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)  $1 \text{ ml}$  を  $4^\circ\text{C}$  で5分間、加えた。可溶化された細胞を  $4^\circ\text{C}$  で5分間、 $10,000\text{g}$  で遠心し、上清を  $-70^\circ\text{C}$  で保持するか、さらにプロセッシングした。

自己りん酸化のEGF刺激は、免疫沈降に先立って  $0.4 \text{ ml}$  中、TX-100の濃度を  $0.5\%$  に希釈しておいた界面活性剤による細胞リゼイトと  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  EGFとを  $4^\circ\text{C}$  で15分間インキュベートすることにより誘導した。30分間プロテインA-セファロースに予め結合させておいたR1抗体を加え( $1 \mu\text{l}$  抗体/ $50 \mu\text{l}$  スラリー、 $1:1$ )、 $4^\circ\text{C}$  で15分間インキュベーションを続けた。免疫沈降物をHNTGバッファー( $20 \text{ mM}$  HEPES,  $\text{pH} 7.5$ 、 $150 \text{ mM}$  NaCl、 $10\%$  グリセロール、および  $0.1\%$  トリトンX-100)  $0.9 \text{ ml}$  中で5回洗浄した。容量  $30 \mu\text{l}$  の洗浄した免疫沈降物を  $5 \text{ mM}$  MnCl<sub>2</sub> に調整し、 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP  $15 \mu\text{Ci}$  を  $4^\circ\text{C}$  で0.5分間加えた。3倍濃度のSDS試料バッファー  $20 \mu\text{l}$  を加えて

自己りん酸化を終了させた。試料を5分間煮沸し、遠心し、 $20 \mu\text{l}$  づつ、 $5\%/7\%$  ポリアクリルアミド還元ゲルで分析した(ラエムリ、1970)。減圧下、 $70^\circ\text{C}$  でゲルを固定し、乾燥させた。対照として、正常なRat I 線維芽細胞を用いた。サイズマーカーはキロダルトンで示されている。野生型のEGFリセプター同様、HER-erbBハイブリッドにより、免疫沈降物中に有意量の $^{32}\text{P}$ が取り込まれた。りん酸化の程度はEGFの添加(+で表されている)によって増大し、30秒間の測定では、EGFの存在下においてりん酸化の速度は3倍高いことが分った。v-erbBタンパク質はそれ自身、極めて低い自己りん酸化活性を有するにすぎない[ラックスら(Lax)、1985、EMBOジャーナル 4:3179~3182]。ハイブリッドの自己りん酸化活性は低いが、EGF結合領域の再構築により、リガンドによって自己りん酸化活性が誘導され得る。

#### 4. 図面の簡単な説明

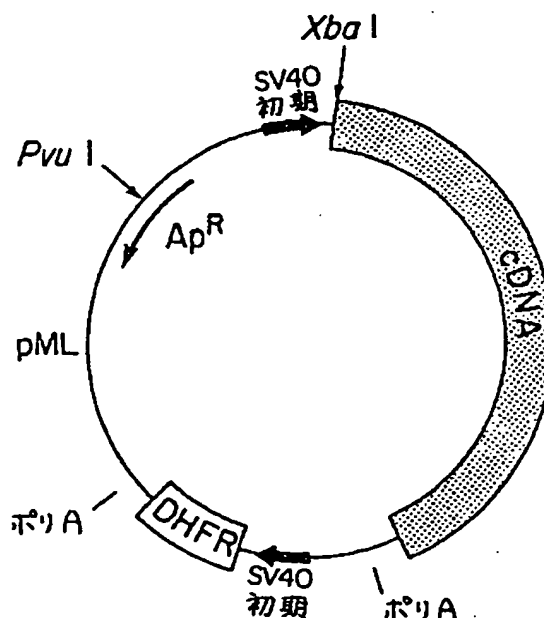
第1a図は、インシュリンリセプター(HIR)

と表皮性成長因子リセプター(HER)とのハイブリッドリセプターの模式図である。第1b図は、HIR、HERおよびこれらのハイブリッドリセプターを比較して示した模式図である。第2図は第1a図のcDNA組立て物でトランスフェクトされたCOS-7細胞における $^{125}\text{I}$ インシュリンの結合程度を示すグラフである。第3a~3d図は、種々に形質転換された細胞の免疫沈降-自己りん酸化産物のSDS-PAGE還元ゲル電気泳動の結果を示す写真の複写図である。第4図はハイブリッドリセプターHER-erbBの模式図である。第5図はリガンドの存在(+ )したおよび非存在下(-)におけるHER-erbBのゲル電気泳動の結果を示す写真の複写図である。

特許出願人 ジェネンテック、インコーポレイテッド

代理人 弁理士 青山 昌 (外1名)

Fig. 1a.



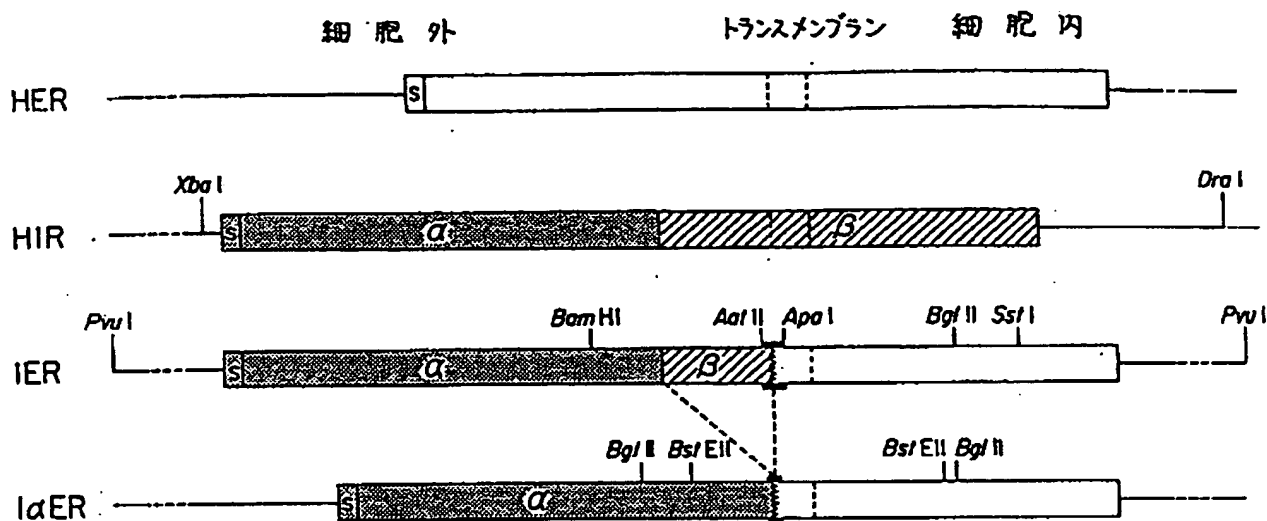


Fig.1b.

Fig.2.

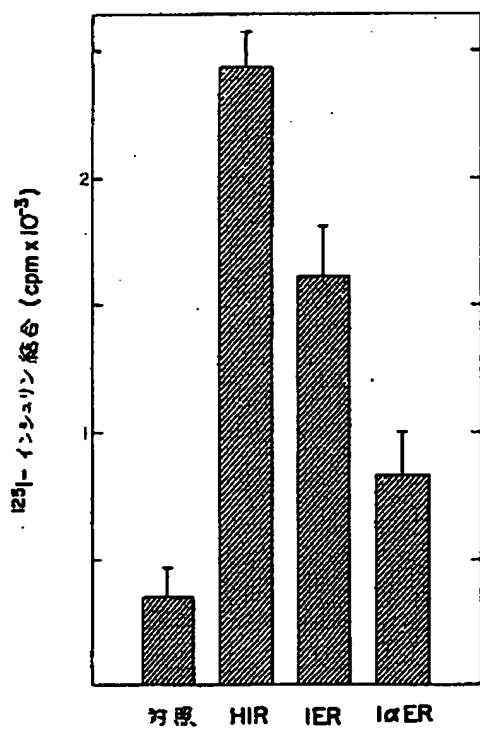


Fig.4.

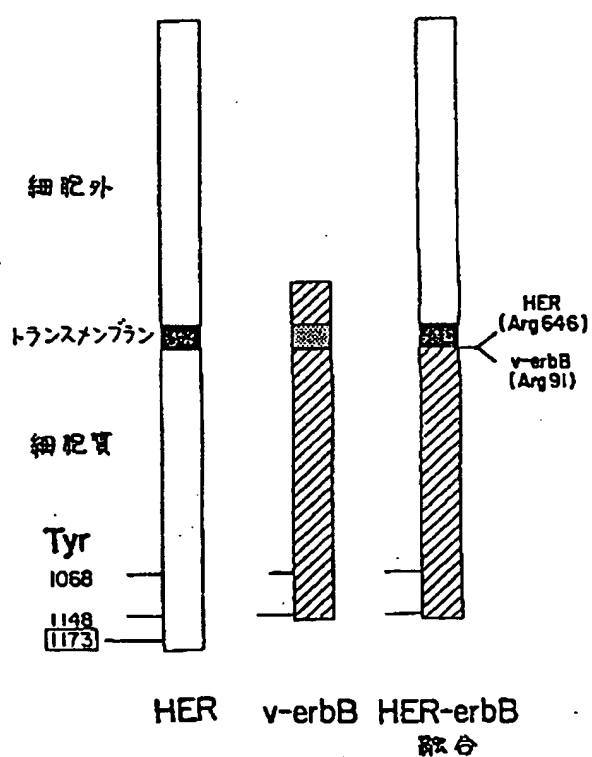


Fig.3.- 1

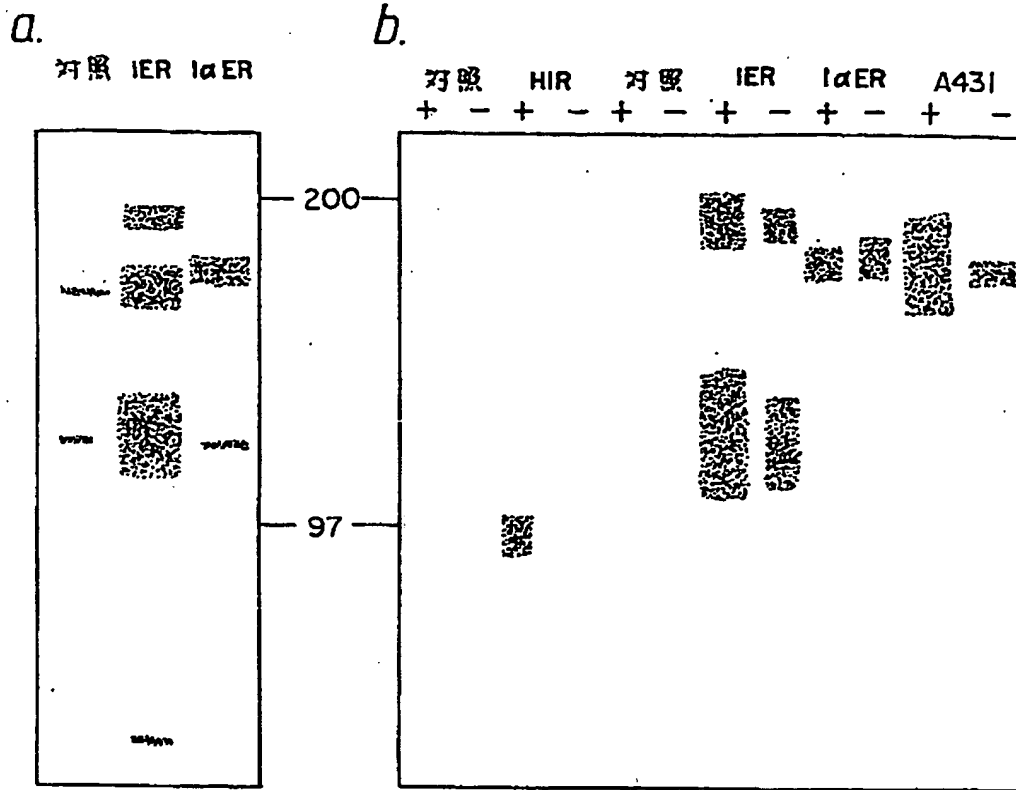
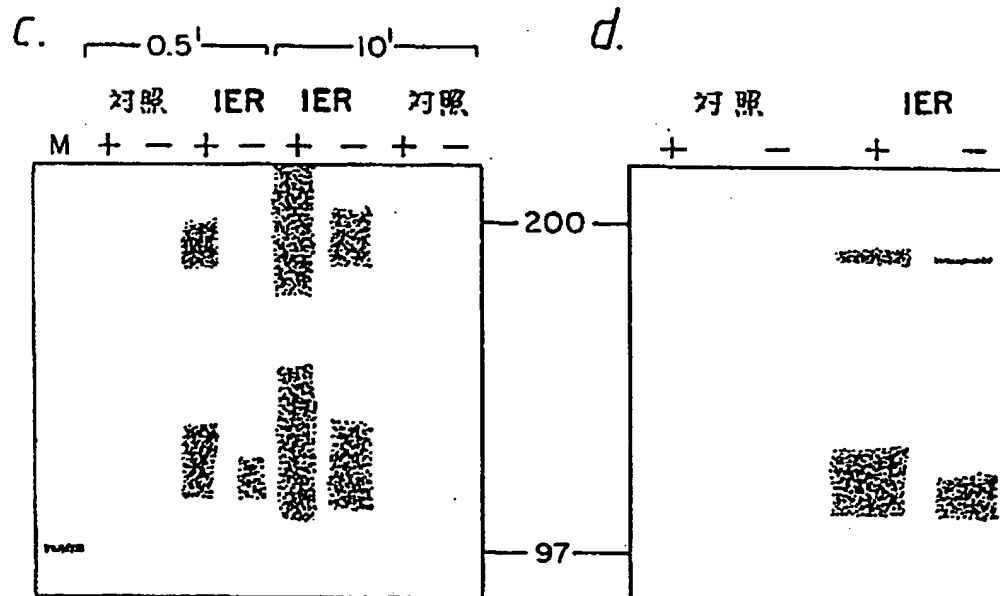


Fig.3.- 2



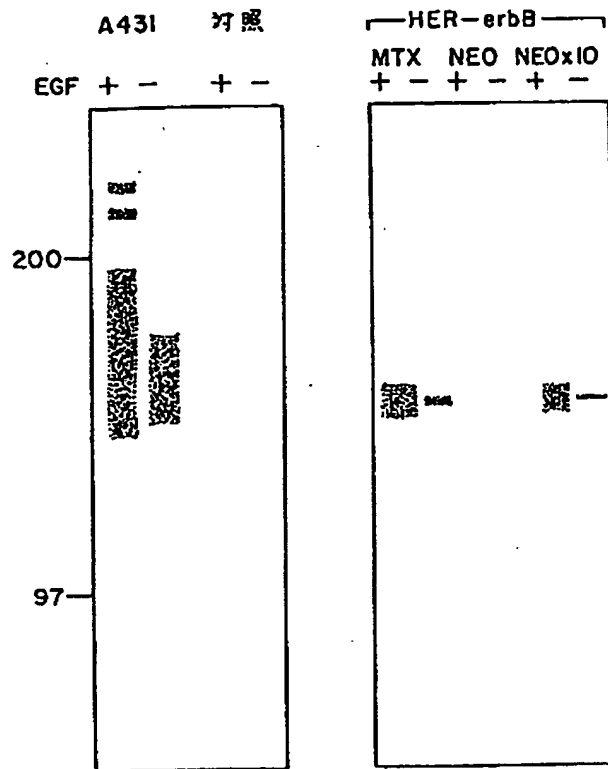


Fig. 5.

第1頁の続き

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 15/00

7115-4B

G 01 N 33/566

7906-2G

33/577

7906-2G

// C 12 Q 1/00

8412-4B

(C 12 P 21/00)

C 12 R 1:19)

⑦発明者 アクセル・ウールリツ  
ヒ

アメリカ合衆国カリフォルニア94117、サン・フランシスコ、アツパー・テラス 433番



## Citation 1

**Hybrid receptors, nucleic acid encoding them, their preparation, and their use in determination of ligands and their antagonists and agonists.**

Patent Number: ☐ EP0244221, B1

Publication date: 1987-11-04

Inventor(s): RIEDEL HEIMO; ULLRICH AXEL; DULL THOMAS JOSEPH

Applicant(s): GENENTECH INC (US)

Requested Patent: ☐ JP62272990<sup>†</sup>

Application Number: EP19870303801 19870429

Priority Number(s): US19860857899 19860430

IPC Classification: C07K15/00; C12N15/00; C07H21/00; G01N33/53; G01N33/68; C12P21/00

EC Classification: G01N33/532, G01N33/566, C07K14/705, C07K14/71, G01N33/68, C07K14/72

Equivalents: CA1328419; DE3751846D, DE3751846T, ES2090007T, HK1008022, JP2592063B2, JP2795833B2, ☐ JP9117285, ☐ US4859609

Cited Documents: US4504587; DE3100061

---

**Abstract**

---

Hybrid receptors, produced by recombinant DNA technology, comprise (a) the ligand binding domain of a predetermined receptor and (b) a heterologous reporter polypeptide. The hybrid receptors are useful for convenient and large scale assay of biologically active ligands or their antagonists or agonists. (a) may be the extracellular domain of the receptor, or a cytoplasmic domain of a receptor or oncogene. (b) may be an enzyme. A transmembrane domain may be interposed between (a) and (b).

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2